

УСТОЙЧИВОСТЬ МАТРИКСА МОНО- И МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗОВАННЫХ МИКРОФЛОРОЙ ПЕРИОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА В СТАТИЧЕСКИХ И ДИНАМИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ IN VITRO И ИХ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ

КОЛЧАНОВА Н.Э.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2017. – Том 16, №5. – С. 136-144.

THE STABILITY OF THE MATRIX OF MONO- AND MULTI-SPECIES BIOFILMS, FORMED BY PERIODONTAL POCKET MICROFLORA, IN STATIC AND DYNAMIC CONDITIONS OF THE ENVIRONMENT IN VITRO AND THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE

KALCHANAVA N.E.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2017;16(5):136-144.

Резюме.

Целью исследования являлось изучить устойчивость матрикса моно- и многокомпонентной биопленок, образованных микрофлорой периодонтального кармана в статических и динамических условиях среды in vitro к ферментам, антисептикам, биологическим жидкостям и их антибиотикорезистентность.

Материал и методы. Изучены микробные биопленки 10 клинических изолятов, полученных от пациентов с хроническим периодонтитом, а также 15 изолятов, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях. Проведено определение способности к разрушению суспензии экзополимерного матрикса моно- и многокомпонентных биопленок в статических и динамических условиях следующими ферментами и антисептиками: альфа-ДНКазы, гиалуронидазы I типа, трипсина, протеиназы К, альфа-амилазы панкреатической, ацетилцистеина, хлоргексидина 0,05% и 2%, диметилсульфоксида 25% перекиси водорода 3%. Определена антибиотикорезистентность планктонных форм *Streptococcus spp.* и в составе биопленки к антибиотикам.

Результаты. При изучении действия антисептиков и ферментов на матрикс биопленок установлено, что наибольшей способностью к разрушению экзополимерного матрикса обладали 25% диметилсульфоксид и протеиназа К. Согласно полученным данным более чувствительным к большинству ферментов и антисептиков был матрикс монобиопленки *Streptococcus spp.* ($p < 0,05$). Чувствительность многокомпонентных биопленок соответствует чувствительности самого устойчивого матрикса. Динамические условия среды влияют на процессы образования биопленки, повышая ее резистентность и устойчивость к антисептикам и ферментам. При изучении чувствительности *Streptococcus spp.* в составе биопленки к антибактериальным препаратам выявлено снижение чувствительности бактерий ко всем исследованным АБ относительно планктонных форм. Выявлена корреляция массы биопленки с уровнем резистентности к антибактериальным препаратам. Таким образом, микроорганизмы, способность которых формировать биопленку выше, более резистентны к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: биопленка, хронический периодонтит, антибиотики, антисептики, ферменты, ротовая жидкость.

Abstract.

Objectives. To study the stability of the matrix of mono- and multi-species biofilms formed by periodontal pocket microflora in the static and dynamic conditions of the environment in vitro to enzymes, antiseptics, biological fluids and

their antibiotic resistance.

Material and methods. Microbial biofilms of 10 clinical isolates, obtained from patients with chronic periodontitis as well as 15 isolates isolated in purulent-inflammatory diseases were studied. The ability to destroy the suspension of the exopolymer matrix of mono- and multi-species biofilms in static and dynamic conditions by the following enzymes and antiseptics was determined: alpha-DNase, hyaluronidase type I, trypsin, proteinase K, alpha-amylase pancreatic, acetylcysteine, 0,05% and 2% chlorhexedin, dimethylsulfoxide 25% hydrogen peroxide 3%. The antibiotic resistance of plankton forms of *Streptococcus* spp and also in the composition of biofilm to antibiotics has been determined.

Results. When studying the effect of antiseptics and enzymes on the biofilms matrix, it has been found that 25% dimethylsulfoxide and proteinase K were the most capable of destroying the exopolymer matrix. According to the data obtained, the matrix of monobiofilm *Streptococcus* spp ($p < 0,05$) was more sensitive to most enzymes and antiseptics. The sensitivity of multi-species biofilms corresponds to the sensitivity of the most stable matrix. The dynamic environmental conditions affect the biofilm formation processes, increasing its resistance and stability to antiseptics and enzymes. When studying the sensitivity of *Streptococcus* spp. in the composition of biofilm to antibacterial drugs, a decrease in the sensitivity of bacteria to all the investigated antibiotics with regard to plankton forms was revealed. The correlation between the biofilm weight and the level of resistance to antibacterial drugs was found. Thus microorganisms the ability of which to form a biofilm is higher are more resistant to antibacterial drugs.

Key words: *biofilm, chronic periodontitis, antibiotics, antiseptics, enzymes, oral fluid.*

Бактериальные биопленки играют важную роль в возникновении хронических инфекционных процессов, особенно при наличии в организме человека различных имплантов, лечебно-диагностических устройств и инструментов – катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца, контактных линз [1, 2]. В настоящее время полагают, что 60-65% инфекционных заболеваний связаны с возбудителями, способными формировать биопленки. Важной особенностью биопленок является их высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям, включая устойчивость к антибактериальным препаратам, что в значительной степени обусловлено наличием экзополимерного матрикса. Показано, что экзополимерный матрикс биопленки может ограничивать диффузию веществ и связывать антимикробные препараты, препятствовать воздействию на бактериальную клетку факторов системы иммунитета. Показано, что отрицательно заряженные экзополисахариды матрикса биопленок весьма эффективно защищают бактерии от гидрофильных и положительно заряженных антибиотиков [3]. Одним из эффективных способов борьбы с инфекцией, вызванной возбудителем, образующим биопленку, может являться разрушение экзополимерного матрикса, поскольку это резко снижает устойчивость бактерий к различным факторам, в том числе антибактериальным препаратам.

Целью исследования являлось изучить устойчивость матрикса моно- и многокомпонентной биопленок, образованных микрофлорой периодонтального кармана в статических и дина-

мических условиях среды *in vitro* к ферментам, антисептикам, биологическим жидкостям и их антибиотикорезистентность.

Материал и методы

Обследование пациентов с хроническим периодонтитом проводилось по единой схеме. В день обращения перед проведением лечебных мероприятий (проба 1) и в день завершения лечения (проба 2) производился забор ротовой жидкости за час до еды в стерильные пробирки. Материал для исследования забирали из периодонтальных карманов с помощью стерильных бумажных штифтов (№30) и транспортировали в лабораторию для идентификации микроорганизмов с помощью тест-систем rapid ID 32 STREP на автоматизированном биохимическом анализаторе ATB EXPRESSION® (Биомерье).

Нами изучены микробные биопленки 10 клинических изолятов, полученных от пациентов с хроническим периодонтитом на базе кафедры терапевтической стоматологии УО «ВГМУ» и УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника», а также изучены 15 изолятов, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях на базе бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии». Смоделированы *in vitro* многовидовые биопленки: трехкомпонентная биопленка – *Streptococcus sanguinis* + *Streptococcus oralis* + *Streptococcus mitis*; двухкомпонентная биопленка – *Staphylococcus*

epidermidis + Streptococcus oralis, Staphylococcus epidermidis + Streptococcus mitis, Streptococcus oralis + Candida albicans, Streptococcus anginosus + Candida albicans.

С целью изучения устойчивости микробной биопленки мы использовали стандартную методику моделирования биопленки на полимерной мембране в прогрессивно истощающейся среде. Оценка способности различных агентов разрушать матрикс бактериальных биопленок производилась посредством разработанного ранее метода [4]. Для пересчета единиц оптической плотности в мкг/мл выделенного Конго-красного использовалась формула:

$$X=(0,101+11,04*[E_{\text{опт. плотн. пробы}} - E_{\text{опт. плотн. контроля}}])^2$$

Нами проведено определение способности к разрушению суспензии экзополимерного матрикса следующими ферментами: альфа-ДНКазы, гиалуронидазы I типа, трипсина, протеиназы К, альфа-амилазы панкреатической. Все ферменты брались в концентрации 1 мг/мл. Также нами исследованы антисептики, используемые в клинической практике врача-стоматолога: хлоргексидин 2 и 0,05%, перекись водорода 3%, диметилсульфоксид 25%, а также ацетилцистеин. Чувствительность к антибактериальным препаратам планктонных форм бактерий и бактерий в составе биопленки, а также в качестве критерия чувствительности изолята к антибиотикам (АБ) использовались рекомендации Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (EUCAST, 2017).

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных таблиц «Statistica» (Version 10-Index, лицензия №СТАФ999К347156W, StatSoft Inc., США). Показатели устойчивости смешанной биопленки и сформированной в разных условиях среды име-

ли нормальное распределение (р для критерия Шапиро-Уилка во всех группах >0,05), результаты представлены в виде $M \pm \sigma$ (М-среднее значение, σ -стандартное отклонение). Для оценки данных активности ротовой жидкости, антисептиков, ферментов на матрикс биопленки и антибиотикорезистентности применены методы непараметрической статистики и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием нижнего 25-й (LQ) и верхнего 75-й квартилей (UQ). В этом случае для анализа различий в двух зависимых группах по количественному признаку применялся непараметрический t- критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Представляется важным определить какие ферменты, особенно присутствующие в биологических жидкостях человека, и антисептики, распространённые в клинической практике, способны разрушать матрикс биопленки, а также сравнить устойчивость биопленки стрептококков с другими микроорганизмами, способными образовывать биопленку.

Среди исследуемых антисептиков и ферментов мы изучили, какие из предложенных веществ обладают достоверно более высокой активностью на матрикс биопленки всех микроорганизмов вне зависимости от видовой принадлежности (табл. 1).

При исследовании всех изолятов бактерий наибольшая способность к разрушению экзополимерного матрикса биопленки наблюдалась у 25% диметилсульфоксида (63,25; 36,95-71,86), что было достоверно ($p < 0,001$) выше, чем у всех других исследованных агентов. Из ферментов относительно высокая способность к разрушению матрикса биопленки обнаружена у протеиназы К (18,83; 6,28-34,97), что достоверно ($p < 0,05$) превы-

Таблица 1 – Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс монобиопленок (n=25)

Активное вещество	Me, LQ – UQ, мкг/мл
Диметилсульфоксид 25%	63,25; 36,95-71,86
Перекись водорода 3%	0,03; 0-0,35
Хлоргексидин 2%	0; 0-1,21
Хлоргексидин 0,5%	0; 0-0,09
Ацетилцистеин	0,02; 0-0,26
Протеиназа К	18,83; 6,28-34,97
Гиалуронидаза I типа	1,52; 1,12-6,71
Альфа-ДНКаз	2,41; 0,38-14,67
Трипсин	3,46; 1,74-12,95
Альфа-амилаза	0; 0-0,38

шало активность других исследованных агентов.

Нами было взято несколько изолятов стрептококков разных видов и стафилококков от пациентов с хроническим периодонтитом, а также другие наиболее распространенные возбудители гнойно-воспалительных заболеваний (табл. 2).

Исходя из полученных данных проанализирована значительная межвидовая и внутривидовая гетерогенность устойчивости матрикса биопленок по отношению исследуемым ферментам и антисептикам. Наибольшая внутривидовая вариабельность данных наблюдалась у изолятов *E. coli* к гиалуронидазе и трипсину. В тоже время

наибольшая чувствительность матрикса монобиопленки как и ранее у всех изученных нами изолятов наблюдалась к диметилсульфоксиду 25%, несмотря на существенные колебания значений внутри видов, и протеиназе К.

Смоделированные нами многовидовые биопленки, учитывая ассоциации бактерий, выделенные при ХП, также были изучены на способность ферментов и антисептиков разрушать их экзополимерный матрикс (табл. 3-5).

Согласно полученным данным более чувствительным к большинству ферментов и антисептиков был матрикс монобиопленки *Streptococcus*

Таблица 2 – Способность активных веществ к расщеплению экзополимерного матрикса монобиопленок микроорганизмов, мкг/мл, Me, LQ – UQ, (min/max)

Исследуемый изолят / Активное вещество	<i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=6)	<i>S. epidermidis</i> (n=4)	<i>S. aureus</i> (n=6)	<i>E. coli</i> (n=6)	<i>P. aeruginosa</i> (n=3)
Гиалуронидаза I (<i>bovine testis</i>)	4,7 1,13-7,5 (0,4/9,6)	3,79 2,65-4,14 (1,8/4,1)	7,33 1,45-10,1 (0,7/11,8)	3,52 0,74-7,65 (0,04/11,7)	0,45 0,22-0,54 (0,2/0,5)
Трипсин (<i>bovine pancreas</i>)	16,1 3,69-27,3 (3,7/33,3)	1,7 1,1-2,5 (1/2,6)	8,0 1,57-14,1 (1,5/35,7)	3,17 2,25-4,01 (0,07/23,3)	0,7 0,2-4,1 (0,2/4)
Протеиназа К (<i>tritrachium album</i>)	44,05 8,1-55,3 (1,1/82,5)	5,0 2,8-8,1 (1,7/9,9)	11,92 5,1-18,1 (3,9/18,2)	28,45 9,7-49,7 (4,1/58,7)	3,8 2,0-19,5 (2/19,5)
Альфа-ДНКаз (<i>human</i>)	16,5 5,1-21,8 (3,7/28)	1,32 1,1-1,8 (0,9/2,1)	1,01 0,73-1,2 (0,38/2,4)	0,48 0,04-14,1 (0/14,1)	1,68 0,1-2,4 (0,08/2,4)
Диметилсульфоксид 25%	89,5 52,1-116,8 (25/164)	21,3 15,1-48,6 (11,8/73,2)	39,86 36,9-47,1 (25,9/172)	54,41 44,5-63,12 (24,1/75,5)	14,6 8,9-63,4 (8,8/63,4)

Таблица 3 – Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс моно- и многовидовых биопленок, мкг/мл, M±σ

Активное вещество	1. <i>Streptococcus spp.</i> + <i>Staphylococcus spp.</i>	2. <i>Streptococcus spp.</i>	3. <i>Staphylococcus spp.</i>	p
Диметилсульфоксид 25%	55,2±6,8	67,5±21,7	44,4±4,1	p>0,05
Протеиназа К	14,3±8,27	45,7±13,5	10,9±2,3	p ₁₋₂ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₃ >0,05
Гиалуронидаза I типа	5,85±1,6	8,5±1,4	8,5±1,4	p>0,05
Трипсин	3,3±0,7	20,9±4,9	3,9±0,35	p ₁₋₂ <0,01 p ₂₋₃ <0,01 p ₁₋₃ >0,05
Альфа-ДНКаз	4,1±2,3	12,86±2,82	3,9±1,69	p ₁₋₂ <0,01 p ₂₋₃ <0,01 p ₁₋₃ >0,05

Таблица 4 – Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс моно- и многовидовых биопленок, мкг/мл, $M \pm \sigma$

БП / Активное вещество	<i>Streptococcus spp.</i> + <i>Candida spp.</i>	2. <i>Streptococcus spp.</i>	3. <i>Candida spp.</i>	p
Диметилсульфоксид 25%	18,25±2,19	20,2±8,4	44,9±22,9	$p > 0,05$
Протеиназа К	0,2±0,1	7,04±1,6	1,8±0,75	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$ $p_{1-3} > 0,05$
Гиалуронидаза I типа	0,58±0,2	1,74±0,23	1,01±0,54	$p > 0,05$
Трипсин	0,03±0,004	3,43±0,32	0,17±0,13	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$ $p_{1-3} > 0,05$
Альфа-ДНКаз	0,056±0,01	1,8±0,42	0,36±0,19	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$ $p_{1-3} > 0,05$

Таблица 5 – Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс многовидовых биопленок, мкг/мл; $M \pm \sigma$

БП / Активное вещество	1. <i>S. oralis</i> + <i>S. sanguinis</i> + <i>S. mitis</i>	2. <i>Streptococcus spp.</i> + <i>Candida spp.</i>	3. <i>Streptococcus spp.</i> + <i>Staphylococcus spp.</i>	P
Диметилсульфоксид 25%	82,4±1,79	18,25±2,19	55,2±6,8	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
Протеиназа К	41,9±23,22	0,2±0,1	14,3±8,27	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$
Гиалуронидаза I типа	3,65±0,68	0,58±0,2	5,85±1,6	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$
Трипсин	14,4±2,08	0,03±0,004	3,3±0,7	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$
Альфа-ДНКаз	0,77±0,2	0,056±0,01	4,1±2,3	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$

spp. ($p < 0,05$). Чувствительность многокомпонентных биопленок, как правило, близка к чувствительности самого устойчивого матрикса.

Анализ трех- и двухкомпонентных биопленок между собой показал повышение устойчивости двухкомпонентной биопленки *Streptococcus spp.* + *Candida spp.* к исследуемым ферментам и антисептикам.

В физиологических условиях полости рта при ХП формирование биопленки происходит в среде с постоянным током ротовой жидкости. С учетом всех преимуществ и недостатков нами разработано устройства для формирования био-

пленок в динамических условиях, которые соответствуют необходимым для воспроизводства метода в лаборатории. Оно соответствует ряду условий необходимых для удобной работы в лаборатории. Данное устройство многоразовое, простое и удобное для использования, пригодно для стерилизации отдельных его компонентов. Предполагаемое устройство для формирования биопленок в динамических условиях, позволяет изучать структуру биопленки, образованной микроорганизмами *in vitro* в условиях максимально адаптированных к физиологическим в полости рта, и в дальнейшем определять ее чувстви-

ность к ферментам и антисептикам. Движение среды осуществляется в замкнутой системе по комплексу трубок за счет водяной помпы, а изучаемые поверхности с ростом на них биопленки находятся в вертикальном положении за счет фиксаторов из нержавеющей стали [МПК С12М 1/00, № 10170020; заявл. 30.01.2017].

Культивирование биопленки в динамических условиях среды влияет на ее устойчивость к ферментам и антисептикам. Согласно проведенным исследованиям биопленка сформированная в динамических условиях достоверно более стабильна при действии на нее антисептиков и ферментов. Для иллюстрации приведен пример устойчивости изолятов *Streptococcus spp.* (табл. 6).

Ротовая жидкость состоит из смешанной слюны органических примесей, в ее состав входит около 50 ферментов, которые относятся к классам гидролаз, оксидоредуктаз, трансфераз (лизоцим, амилаза и др.). Она играет важную роль в поддержании гомеостаза полости рта и влияет на качество жизни пациента. При статистическом анализе способности ротовой жидкости расщеплять матрикс биопленки установлено, что способность к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis* выше у пациен-

тов с хроническим периодонтитом ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (табл. 7). После проведенного лечения наблюдается достоверное снижение этих показателей практически до уровня контрольной группы ($p < 0,001$).

С целью оценки чувствительности и специфичности метода при использовании его для диагностики хронического периодонтита, был проведен ROC-анализ полученных данных (табл. 8).

Применение ROC-анализа позволило предложить критерий диагностики ХП, уровень активности ротовой жидкости $> 0,28$ мкг/мл со специфичностью 100%, чувствительностью 95% является диагностическим критерием ХП. Установлено, что снижение активности $< 1,01$ мкг/мл указывает на положительную динамику течения заболевания ХП.

При изучении действия антибактериальных препаратов на способность микроорганизмов формировать биопленку обнаружено, что при концентрации антибактериального препарата ниже МПК биопленка формируется без изменений. При концентрации антибактериального препарата равной или выше МПК значения ОП опытных лунок не отличается от значения отрицательного контроля – биопленка не фор-

Таблица 6 – Устойчивость биопленки *Streptococcus spp.*, сформированной в статических и динамических условиях, мкг/мл; $M \pm \sigma$

Активное вещество	Статические условия	Динамические условия	P
ДМСО	46,5±0,8	8,7±0,4	$p < 0,001$
Гиалуронидаза I тип	6,3±0,5	0,31±0,2	$p < 0,001$
Протеиназа	4,9±0,4	2,21±0,3	$p < 0,001$
Трипсин	1,4±0,2	0,27±0,1	$p < 0,001$

Таблица 7 – Способность ротовой жидкости к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. Oralis*

№ п/п	Группа	мкг/мл, Ме; LQ - UQ	p
1	Контрольная (n=11)	1,2; 1,12-1,44	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
2	С ХП до лечения (n=20)	9,09; 6,09-12,2	
3	С ХП после лечения (n=20)	1,86; 1,46-3,069	

Таблица 8 – ROC-анализ данных, полученных при исследовании способности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки

Сравниваемые группы	Диагностический критерий, мг	Специфичность, %	Чувствительность, %	Диагностическая эффективность, %
Хронический периодонтит / Контрольная	$> 0,28$	100	95	75,1-99,2
Хронический периодонтит до / после лечения	$> 1,01$	95	90	68,3-98,5

мируется. При исследовании воздействия антибактериальных препаратов на сформированную в полистироловом планшете биоплёнку было обнаружено отсутствие разрушения её матрикса.

Для изучения эффективности возможного применения антибактериальных препаратов для лечения тяжелых форм и обострения ХП проведено сравнение МПК антибиотиков для планктонных форм бактерий и микроорганизмов в составе биоплёнок. С этой целью нами изучены 20 изолятов *Streptococcus spp.*, способных формировать биоплёнку.

Изоляты *Streptococcus spp.* планктонных форм оказались наиболее чувствительны к амоксициллину, тигециклину и меропенему (100% чувствительных изолятов), моксифлоксацин – 95%, цiproфлораксацин – 90% чувствительных изолятов и имипенем – 80% чувствительных изолятов. В тоже время к бензилпенициллину только 75% исследуемых изолятов продемонстрировали чувствительность (табл. 9).

Изоляты *Streptococcus spp.* в составе биоплёнки оказались наиболее чувствительны к фторхинолонам: цiproфлораксацин – 75%, моксифлоксацин – 85% чувствительных изолятов, а также к тигециклину – 85%. Чувствительность к карбапенемам была значительно ниже: меро-

пенем – 70%, имипенем – 60% чувствительных изолятов (табл. 10). Очень резко снизилась чувствительность микроорганизмов в составе биоплёнки по сравнению с планктонными формами для амоксициллина (со 100% до 25% чувствительных изолятов) и бензилпенициллина (с 75% до 5% чувствительных изолятов).

При сравнении МПК90 *Streptococcus spp.* в составе биоплёнки обнаружено, что резистентность к АБ микроорганизмов выросла от 2 до 500 раз для различных видов антибиотиков по сравнению с планктонными формами. При изучении чувствительности *Streptococcus spp.* в составе БП к АБ выявлено снижение чувствительности бактерий ко всем исследованным АБ относительно планктонных форм. Результаты представлены на рисунке 1.

При анализе зависимости резистентности к АБ от массы БП выявлена достоверная положительная корреляция между исследованной массой сформированной биоплёнки и количеством антибактериальных препаратов, к которым микроорганизм резистентен ($r=0,65$, $p<0,01$).

Заключение

1. При изучении действия антисептиков и ферментов на матрикс биопленок установлена

Таблица 9 – Чувствительность клинических изолятов *Streptococcus spp.* планктонные формы

	S, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Среднегеометрическая МПК	Min/max	Квартили
Амоксициллин	100	0	0	0,125	0,125	0,063/0,125	0,125-0,125
Бензилпенициллин	75	25	0,125	8	0,125	0,016/256	0,125-4,13
Имипенем	80	20	0,016	1	0,016	0,016/4	0,016-0,016
Меропенем	100	0	0,016	0,063	0,016	0,016/0,5	0,016-0,031
Моксифлоксацин	95	5	0,063	1	0,063	0,016/2	0,016-0,5
Цiproфлораксацин	90	10	0,25	0,5	0,25	0,015/4	0,125-0,5
Тигециклин	100	0	0,016	0,25	0,016	0,016/0,5	0,016-0,016

Таблица 10 – Чувствительность клинических изолятов *Streptococcus spp.* в составе биоплёнки

	S, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Среднегеометрическая МПК	Min/max	Квартили
Амоксициллин + клавулановая кислота	25	75	16	64	24	0,125/256	4,1-64
Бензилпенициллин	5	95	32	256	48	0,25/256	8-256
Имипенем	60	40	0,5	2	0,5	0,125/32	0,5-2
Меропенем	70	30	0,5	1	0,5	0,016/32	0,38-1
Моксифлоксацин	85	15	0,25	1	0,38	0,016/32	0,13-1
Цiproфлораксацин	75	25	0,5	2	0,5	0,125/32	0,25-1,5
Тигециклин	85	15	0,016	0,5	0,1	0,016/4	0,016-0,5

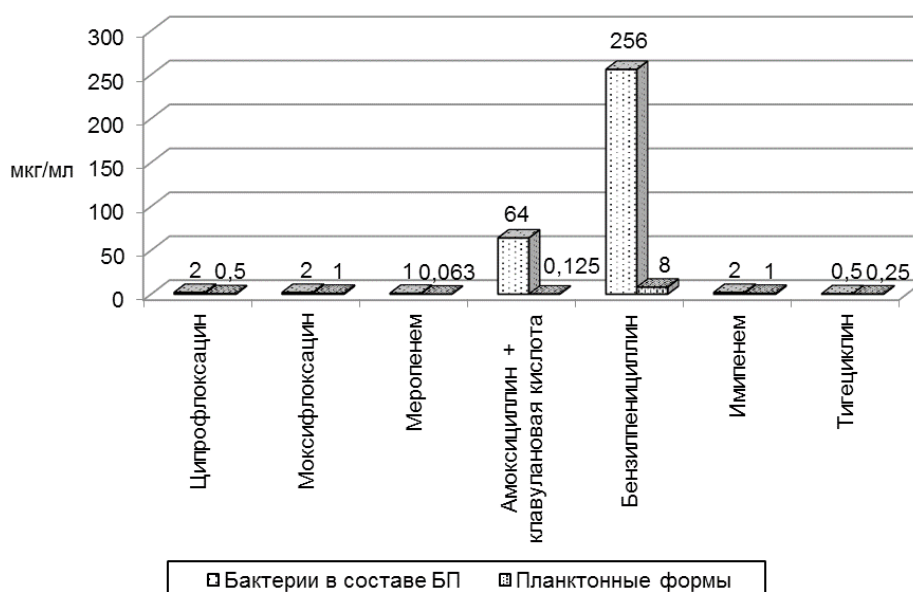


Рисунок 1 – МПК90 планктонных форм *Streptococcus spp.* и бактерий в составе биоплёнки к АБ.

значительная межвидовая и внутривидовая гетерогенность устойчивости матрикса биопленок по отношению к исследуемым ферментам и антисептикам. В тоже время несмотря на различия наибольшей способностью к разрушению экзополимерного матрикса обладали 25% диметилсульфоксид (63,25; 36,95-71,86 мкг/мл) и протеиназа К (8,83; 6,28-34,97 мкг/мл), что было достоверно ($p < 0,001$) выше, чем у всех других исследованных ферментов и антисептиков.

2. Согласно полученным данным более чувствительным к большинству ферментов и антисептиков был матрикс монобиопленки *Streptococcus spp.* ($p < 0,05$). Чувствительность многокомпонентных биопленок, как правило, близка к чувствительности самого устойчивого матрикса. В то же время, анализ трех- и двухкомпонентных биопленок между собой показал повышение устойчивости двухкомпонентной биопленки *Streptococcus spp.* + *Candida spp.* к исследуемым ферментам и антисептикам. Динамические условия среды влияют на биопленку, повышая ее резистентность и устойчивость к антисептикам и ферментам.

3. При изучении резистентности к антибактериальным препаратам планктонных форм и микроорганизмов в составе биопленки установлено, что МПК90 *Streptococcus spp.* выросла от 2 до 500 раз. При изучении чувствительности *Streptococcus spp.* в составе БП к АБ выявлено

снижение чувствительности бактерий ко всем исследованным АБ относительно планктонных форм. Значительно возросла резистентность для группы пенициллинов (бензилпенициллин, амоксициллин + клавулановая кислота), резко снизилась чувствительность при культивировании в составе биоплёнки к карбапенемам (имипенем, меропенем). В то же время, для других антибактериальных средств (ципрофлоксацин, моксифлоксацин, тигециклин) наблюдался рост резистентности от 10 до 15% от исходного уровня. Выявлена корреляция массы биопленки и резистентности к антибактериальным препаратам. Таким образом, микроорганизмы, способные формировать биопленку выше, более резистентны к антибактериальным препаратам.

Литература

1. Образование биопленок стафилококков на поверхности титана и титана с углеродной алмазоподобной пленкой и действие на них низкомолекулярного катионного пептида варнерина / И. Ш. Трахтенберг [и др.] // Перспектив. материалы. – 2013. – № 4. – С. 39–44.
2. Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy / Y. H. An [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 1995 Nov. – Vol. 24, N 1. – P. 29–40.
3. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A / I. Sadovskaya [et al.] // Infect. Immun. – 2005 May. – Vol. 73, N 5. – P. 3007–3017.

4. Колчанова, Н. Э. Определение образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивости к химическим и биологическим объектам

/ Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2015. – № 3. – С. 56–61.

Поступила 20.07.2017 г.

Принята в печать 10.10.2017 г.

References

1. Trakhtenberg ISh, Rubshteyn AP, Lemkina LM, Korobov VP, Morozov IA A. Formation of biomembranulas of staphylococci on the surface of titanium and a titanium with carbon diamondlike Membranula and action on them a low-molecular cationic peptide of a varnerin. Perspektiv Materialy. 2013;(4):39-44. (In Russ.)
2. An YH, Friedman RJ, Draughn RA, Smith EA, Nicholson JH, John JF. Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. J Microbiol Methods. 1995 Nov;24(1):29-40. doi: 10.1016/0167-7012(95)00051-8
3. Sadvskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, Staphylococcus epidermidis RP62A. Infect Immun. 2005 May;73(5):3007-17.
4. Kolchanova NE, Okulich VK, Shilin VE. Definition of formation of microbial biomembranula bacteria of a periodontal pocket and its fastness to chemical and biological objects. Immunopatologiia Allergologiia Infektologiia. 2015;(3):56-61. (In Russ.)

Submitted 20.07.2017

Accepted 10.10.2017

Сведения об авторах:

Колчанова Н.Э. – аспирант кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Kalchanava N.E. – postgraduate of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра клинической микробиологии. E-mail: natali.kolchanova777@gmail.com – Колчанова Наталья Эдуардовна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Clinical Microbiology. E-mail: natali.kolchanova777@gmail.com – Natalia E. Kalchanava.